

24
2cs



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN



"EMPLEO DEL PERRO COMO MODELO EXPERIMENTAL EN EL SINDROME UREMICO HEMOLITICO"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
LUCIA ANGELICA GARCIA CAMACHO



Director de Tesis:
Q.B.P. GUILLERMO VALDIVIA ANDA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1990



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

24
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

"EMPLEO DEL PERRO COMO MODELO EXPERIMENTAL EN EL SINDROME UREMICO HEMOLITICO"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
LUCIA ANGELICA GARCIA CAMACHO



Director de Tesis:

Q.B.P. GUILLERMO VALDIVIA ANDA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Cuautilán Izcalli, Edo. de Méx.

1990

I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
OBJETIVOS	13
MATERIAL Y METODOS	14
RESULTADOS	31
DISCUSION	54
CONCLUSIONES	65
BIBLIOGRAFIA	67

R E S U M E N

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una enfermedad de la niñez caracterizada por provocar anemia hemolítica microangiopática, insuficiencia renal aguda, uremia y trombocitopenia, se ha relacionado con infección por diversos serogrupos de E. coli que tienen la capacidad de producir Verotoxinas (VT) aunque la patogenia no ha sido bien establecida.

Con el propósito de establecer un modelo experimental para el estudio de la patogenia y el papel de las toxinas en este síndrome, se inocularon varias cepas de E. coli productoras de Verotoxinas en un asa duodenal aislada mediante cirugía intestinal en perros. Estos animales fueron mantenidos durante 5 semanas, en las cuales se muestrearon periódicamente para realizarles pruebas de biometría hemática completa, conteo plaquetario directo, examen general de orina, urea sérica, hemoglobina plasmática y haptoglobina sérica. Al término del experimento los animales fueron sacrificados para estudios patológicos y bacteriológicos.

En algunos animales inoculados se encontró evidencia de hemólisis intravascular, ligera anemia, trombocitopenia y daño renal sin llegar a desarrollar uremia. La toxina VT2 parece ser la más involucrada en la aparición de los hallazgos de laboratorio. Los resultados sugieren que la prueba de Hemoglobina plasmática es más sensible para determinar hemólisis intravascular que la de Haptoglobina sérica y que el canino puede ser un modelo experimental útil para realizar estudios posteriores sobre esta enfermedad.

I N T R O D U C C I O N

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una enfermedad que ataca en la niñez y que se caracteriza por provocar falla renal aguda, anemia hemolítica microangiopática, uremia y trombocitopenia (17, 18, 44).

La etiología del SUH no ha sido bien determinada, se había asociado con una gran variedad de agentes enteropatógenos como Shigella sp. (4), Salmonella sp. (18) y otros ya que su aparición ocurría después o coincidía durante la infección con dichos agentes. Los resultados de estudios posteriores sugieren que existe una fuerte relación de SUH y la infección por ciertos serogrupos "O" de E. coli que tienen como característica común la producción de una potente citotoxina (denominada Verotoxina por su efecto citolítico sobre cultivo de células Vero) diferente a las toxinas termoestable y termolábil conocidas de E. coli. Entre los serogrupos productores de Verotoxina (VT) se encuentran el O157, O26 y O111 (6, 17, 18, 25, 35, 44).

La aparición del SUH se considera como una de las varias manifestaciones clínicas compatibles con infecciones por E. coli productoras de VT (VTEC), ya que los pacientes que lo desarrollan presentan 4-10 días antes, como signo prodrómico, una diarrea profusa hemorrágica (6, 17, 18, 25, 35, 44). En un estudio epidemiológico de pacientes con Colitis Hemorrágica destacó el hecho de que la única bacteria aislada de las heces fue E. coli

O157:H7 y se asoció al consumo de carne de res mal cocida (32), dicho serotipo es el reportado más frecuentemente en los casos SUH (44). Este hallazgo, aunado a otras epidemias causadas por E. coli O157:H7 como la que se suscitó en Canadá durante la visita de un grupo de niños a una granja, de los cuales la mayoría presentaron cuadro diarreico y 3 de ellos desarrollaron SUH después de haber consumido leche sin pasteurizar, puede enmarcar al bovino como un reservorio primario de este serotipo debido a que fue aislado de muestras de heces de animales sanos del hato en cuestión (8).

En respuesta a esta posibilidad se han realizado estudios para establecer si la enfermedad es de naturaleza zoonótica, tal es el caso del reexamen en Argentina de cepas de E. coli de origen bovino correspondientes al serotipo O157:H7 encontrándolas a todas productoras de VT (29). También se ha aislado de muestras frescas de carne de res, cerdo, carnero y pollo, confirmando dichos aislamientos con pruebas bioquímicas, serológicas y de citotoxicidad en células Vero; estos resultados nos indican que no es raro este microorganismo como contaminante en las muestras de carne para el consumo humano (11).

A medida que fueron avanzando las investigaciones acerca de la producción de toxinas por estos serotipos se fue encontrando que existía una fuerte similitud entre la toxina de Shigella dysenteriae tipo 1 (bacilo de Shiga) y la toxina producida por E. coli, ya que esta era seroneutralizable por el antisuero

contra Shigella denominándole entonces como "Shiga Like Toxin" (SLT) y postulándose que era la misma VT descrita anteriormente (26).

Ciertas diferencias hicieron sospechar que se trataba de toxinas distintas. La VT está presente en el sobrenadante libre de células de cultivos de VTEC (35) y no es seroneutralizable por el antisueron contra Shigella (33) y la SLT había sido obtenida a partir de un sonicado de células (26).

Además se encontró que la producción de estas toxinas por E. coli es mediada por Bacteriofagos (Fagos) (35, 36, 42) posteriormente se determinó que aparentemente son dos Fagos distintos (27). Debido a esto la clasificación y nomenclatura de la toxinas tiene dos tendencias; una las denomina VT1 y VT2 y la otra las nombra SLT1 y SLT2 manejándose incluso como sinónimos (33, 37).

Existen experimentos en los cuales se ha realizado la transferencia de Fagos provenientes de cepas de E. coli productoras de VT a cepas de E. coli no productoras, como la K12, demostrando por pruebas serológicas y de citotoxicidad en cultivos celulares la adquisición de esta capacidad. En uno de estos experimentos se describe el aislamiento, entre otros, de dos fagos diferentes a partir de una cepa de E. coli 026, la cepa H19, designando a los Fagos como H19A y H19B (36). En otro estudio se demostró que E. coli 0157:H7 cepa 933 también alberga dos Fagos descritos como 933J (VT1) y 933W (VT2). Además los autores

mencionan que las toxinas puras de E. coli O157:H7 cepa 933, E. coli O26 cepa H30 y Shigella dysenteriae tipo 1 cepa 60R tienen la misma subunidad estructural y la misma actividad biológica y que el Fago 933J es muy similar al H19A y a un tercer Fago llamado H19J, aunque no son idénticos. Se aseveran que existe una familia de Fagos que codifican la producción de VT en cepas E. coli y que la conversión fágica efectuada en E. coli K12 da por resultado un aumento considerable de los títulos de VT (27).

Debido a este tipo de investigaciones se conoce que los genes que controlan la producción de VT son codificados por Fagos en algunas cepas de E. coli y que las secuencias han sido recombinadas en E. coli K12 por conversión fágica originandose de ese modo cepas que producen VT1 o VT2 (39).

Las propiedades de las cepas del serogrupo O157, de acuerdo a la producción de citotoxinas (VT1 y VT2) nos clasifican a las cepas en tres grupos: las que sólo producen VT1, las que sólo producen VT2 y las que producen ambas toxinas. El serotipo O157:H7 cepa 933 se encuentra dentro del tercer grupo (33).

Con respecto a las cepas VTEC de origen animal se ha comprobado que pueden ser identificadas con antisueros y pruebas de hibridación de DNA para VT1 y VT2 de origen humano. Las cepas aisladas para este propósito provinieron de animales con problemas diarreicos y algunas muestras se originaron de casos porcinos con enfermedad del edema. La mayoría de los serogrupos encontrados no son asociados con VTEC de origen humano, excepto los serogrupos

Q26, 0111 y 0153. Las cepas bovinas probadas demostraron sólo producir VT1 o VT2 en altos títulos. Las cepas porcinas sólo produjeron VT2 y en títulos más bajos que las bovinas. De cualquier forma se requieren más estudios para determinar las posibles fuentes de infección del SUH y para examinar con más detalle la producción de VT a partir de cepas de origen animal (37).

La patogenia del SUH no está bien establecida, se ha formulado una hipótesis. Esta propone que la toxina VT daña las paredes de los glóbulos rojos produciéndose una hemólisis intravascular (anemia), las membranas celulares de los eritrocitos se depositan en los glomérulos renales; desencadenándose en esa zona una reacción inmune mediada por Complemento que a su vez conduce a una glomerulonefritis que acarrea como consecuencia una uremia renal. La trombocitopenia es resultado de la acción de las endotoxinas de E. coli al producirse una coagulación intravascular diseminada (CID).

La observación de lesiones de microangiopatía y daño a células endoteliales, similares a las que se han visto en los humanos, desarrolladas posteriormente a la inyección parenteral de VT en conejos así como la alta selectividad de tejidos involucrados; principalmente hígado y cerebro, fundamenta la hipótesis de que estos daños se producen por la acción directa de la toxina. La trombocitopenia coincide con una anomalía del factor VIII de la coagulación encontrado en los plasmas de los pacientes en la fase aguda del SUH, siendo este hecho altamente sugestivo de la

baja en el conteo plaquetario. Este factor es sintetizado por las células endoteliales y se piensa que la acción de la VT sobre esas células sea la responsable de la anomalía de dicho factor (19,28,44).

Se han realizado experimentos para estudiar los mecanismos de patogenicidad de las bacterias involucradas en el SUH en los que se ha pretendido reproducir la enfermedad en animales con el objeto de establecer una posible patogenia del SUH.

En algunos de ellos se ha observado que las toxinas VT han demostrado ser letales al administrarse por vía intravenosa en conejos y ratones, presentándose la muerte a las 30-48 horas y a los 2-6 días postinoculación respectivamente, manifestándose antes de esta parálisis de miembros posteriores (36).

Al inocular por vía oral cepas de E. coli O157:H7 en cerdos gnotobióticos y sacrificarlos a los 3 y 5 días postinoculación los animales desarrollaron diversos grados de diarrea, sin llegar ésta a ser hemorrágica. Las lesiones ocasionadas van desde una superficie intestinal erosionada hasta úlceras; siendo más severas en intestino grueso. También se observaron bacterias proliferando en focos de necrosis e invasión de bacterias en vasos sanguíneos de la lámina propia intestinal. Las lesiones encontradas son similares a las producidas por cepas enteropatógenas de E. coli (42).

En base a los resultados anteriormente citados, los autores de dicho reporte aseveran que el cerdo puede ser un modelo útil para seguir estudiando la patogenia de la diarrea causada por esta bacteria. En un estudio similar que consistió en examinar el papel de las toxinas y del factor de adhesión fimbrial codificado por un plásmido de 60 MDA los autores concluyen, que ni el plásmido ni la capacidad de producir toxinas es esencial para la expresión de la patogenicidad de E. coli O157:H7 y contrario a lo que se esperaba se determinó que los lechones no son tan susceptibles al efecto de las toxinas, por lo menos en este experimento (43).

La inoculación intragástrica y la prueba de esa intestinal ligada en conejos es utilizada para determinar si la cepas de E. coli desarrollan en intestino "ataching and effacing" (AEEC), que se describe como la capacidad que tienen las cepas de adherirse íntimamente y destruir las microvellocidades del enterocito. En estas pruebas se han encontrado cepas VTEC que son a su vez AEEC (23).

Existe otro modelo experimental en el que utilizó a conejos; estos fueron inoculados con distintos serotipos de E. coli productoras de VT por vía oral y depositadas a nivel gástrico. Los animales fueron sacrificados a los siete días posteriores a la inoculación. Los resultados que reportan en cuanto a la reproducción del SUH son negativos. Se presentó diarrea en algunos casos, pero en ninguno fue de índole hemorrágica. En su discusión los autores sugieren que probablemente se requiere un periodo más

largo de infección y que el conejo pudiera no ser el modelo animal más apropiado, recomendando experimentar en otra especie animal (35).

Retomando este hecho se propone al canino como un modelo biológico adecuado para intentar determinar una posible patogenia del SUH debido a que es un animal fácil de conseguir y manejar (30), que responde a la hemólisis intravascular desarrollando una glomerulopatía mediada por complejos inmunes que le produce una insuficiencia renal aguda (1, 15). Si a esto le adicionamos que es el animal más empleado en cirugía experimental por sus semejanzas anatómicas, sobretodo a nivel gastrointestinal, con el humano, se enmarcaría al perro como modelo experimental útil en este padecimiento.

En muchas ocasiones se tiene que recurrir a la implantación de modelos quirúrgicos experimentales, que si bien no reflejan del todo lo que normalmente sucedería en una enfermedad, pueden arrojar datos que suelen ser de gran apoyo para tratar de descubrir lo que ocurre en esos cuadros morbosos. En la cirugía intestinal donde a menudo se inoculan experimentalmente bacterias el duodeno juega un papel importante, ya que es considerada como una zona relativamente aséptica del tracto gastrointestinal donde las bacterias no tienen que competir con las que constituyen la flora normal. Es primordial ubicar anatómicamente al duodeno en el perro. El duodeno se fija a la pared abdominal por mesenterio que toma el nombre de mesoduodeno, el cual es relativamente corto por lo que

el movimiento de esta porción intestinal es bastante restringido. A la salida del estómago (en el píloro), el duodeno se dirige por la derecha caudalmente, en dirección pélvica; cruza luego hacia la izquierda, por detrás del mesenterio común y se flexiona para corresponder con la flexura duodenoyeyunal (13). El ligamento duodenocólico puede ser utilizado (al igual que el páncreas) como referencia. Corre de la flexión caudal del duodeno al colon descendente izquierdo, y en ocasiones se le ha confundido como una adherencia (7).

Para conseguir aislar un segmento duodenal in vivo durante un tiempo considerable, con el propósito de inocular bacterias simulando una asa ligada se puede hacer uso de una técnica de resección intestinal; sólo que el área intestinal reseccionada se mantiene viable con irrigación y cerrada por ambos lados. El principal criterio para la valoración de cualquier técnica de anastomosis incluye la ausencia de goteo, oclusión mínima del lumen, formación mínima de adherencias y tiempo de cicatrización. Considerando estos criterios una técnica simple de inversión es más segura (3). Una técnica quirúrgica de elección para realizar este tipo de intervención es la resección del intestino y anastomosis abierta termino-terminal descrita por Annis, J.R. y Allen, A.R.; (2) pues cumple con principio de inversión además de que es fácil de realizar, rápida y presenta un peligro mínimo de estenosis.

De acuerdo a las características del SUH, las pruebas de laboratorio de elección que ayudan a valorarlo son:

a) Nitrógeno Ureico Sanguíneo (NUS): Es útil para establecer el grado de uremia que se presente.

b) Hematocrito, hemoglobina y conteo de glóbulos rojos: Determinan que tipo de anemia y el momento en el que se produce en el SUH.

c) Conteo plaquetario directo: Ayuda a evidenciar la trombocitopenia (5).

d) Haptoglobina sérica: Ya que sus niveles disminuyen abruptamente en una crisis hemolítica intravascular, su medición es de gran apoyo en este síndrome donde la hemólisis juega un papel tan importante (39)

e) Hemoglobina plasmática: De la misma manera que la prueba anterior su medición es importante en procesos hemolíticos intravasculares (39).

f) Examen general de orina (EGO): Debido a que es una prueba sencilla, rápida y de gran ayuda diagnóstica para evaluar la función renal (5).

OBJETIVOS

- ESTABLECER UN MODELO BIOLÓGICO PARA REPRODUCIR Y DETERMINAR LA PATOGENIA DEL SÍNDROME UREMICO HEMOLITICO
- EVALUAR EL PAPEL DE LAS TOXINAS VT1 Y VT2 EN EL SÍNDROME UREMICO HEMOLITICO
- ESTANDARIZAR LAS PRUEBAS PARA CUANTIFICACION DE HAPTOGLOBINA SERICA Y HEMOGLOBINA PLASMÁTICA EN CANINOS

MATERIAL Y METODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Se utilizaron 15 caninos. Siete fueron proporcionados por el bioterio del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Estos animales eran de una camada, raza Weimaraner de un año de edad, siendo 5 machos y 2 hembras gestantes, las cuales se utilizaron por tener la ventaja de tener un buen estado de salud. Los restantes ocho perros fueron facilitados por la Unidad de Cirugía de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C), los cuales provienen de los diversos Centros Antirrábicos de la zona. Para la selección de estos especímenes fueron tomados como criterios: el estado físico del animal (talla mediana a grande, apariencia, actitud, edad aproximada y estado de carnes). A todos los animales se les realizaron las pruebas preoperatorias de laboratorio como fueron la Biometría Hemática, Examen General de Orina y Urea sérica.

A los animales se les proporcionó alimento comercial * y agua a libre acceso, permitiéndoles para su manejo en jaulas comunales o individuales dentro de las instalaciones de la FES-C y fueron observados entre 5 y 7 semanas. Las condiciones de manejo para cada animal fueron similares en todo el grupo excepto en los

* Apican, Anderson Clayton.

que, por motivos ajenos, se mantuvieron en jaulas individuales durante la mayor parte del postoperatorio. Tal fue el caso de los perros No. 11 y 12 (inoculados con la cepa H30), No. 14 (cepa 933), No. 15 (cepa 933W) y No. 16 (cepa 933J) en los que tal motivo las muestras de orina fueron recolectadas por micción directa.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

Los animales fueron seleccionados al azar en 7 grupos de 2 animales cada uno. A todos los animales se les practicó la cirugía de resección intestinal término-terminal modificada y se les sometió al siguiente manejo:

GRUPO 1 : 2 perros Testigo.- Sólo se les practicó la cirugía de resección intestinal término-terminal modificada, que fue realizada en un segmento duodenal de aproximadamente 10 cm.

GRUPO 2 : 2 perros Control Positivo.- A los cuales se les provocó previa cirugía, una hemólisis intravascular por choque osmótico.

GRUPO 3 : 2 perros Control Negativo.- Se les inoculó en el segmento duodenal la cepa apatógena E. coli K12 (C600).

GRUPO 4 : 2 perros.- Inoculados en el segmento duodenal con E. coli 933J productora de VT1.

GRUPO 5 : 2 perros.- Inoculados en el segmento duodenal con E. coli 933W productora de VT2.

GRUPO 6 : 3 perros .- Inoculados en el segmento duodenal con E. coli 933 (O157:H7) productora de VT1 y VT2 aislada de un caso de SUH.

GRUPO 7 : 2 perros .- Inoculados en el segmento duodenal con E. coli H30 productora de VT1 en altas concentraciones y VT2 en bajas concentraciones.

Los datos y características de los animales utilizados en el estudio se observan en el CUADRO No. 1, asimismo se indica el calendario de muestreo realizado en cada animal.

CULTIVOS BACTERIANOS.

Para el presente estudio se utilizaron las cepas de E. coli 933 y H30 descritas por O'Brien A.D. (27) provenientes de Center Disease Culture (CDC). Todas estas cepas y la K12 C-600 fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional. Las cepas fueron conservadas en liofilización en la ENCB, fueron resuspendidas y sembradas por estria cruzada en cajas de petri con agar nutritivo, se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se eligió una colonia con las características bioquímicas, serológicas y de producción de citotoxinas en cultivos celulares Vero correspondientes y se sembró en caldo soya tripticasa incubándose nuevamente a 37°C durante 18 horas, se ajustó la concentración a la equivalente al tubo No. 2 del Nefelómetro de MacFarland. Dicho cultivo fue el que finalmente se inoculó en el segmento intestinal de los animales en experimentación.

CUADRO 1

NUMERO DE IDENTIFICACION, CARACTERISTICAS Y CALENDARIO DE MUESTREO DE LOS ANIMALES DE ESTUDIO

Nº. TRATAMIENTO	SEXO	RAZA	EDAD AÑOS	NUMERO DE MUESTREO													
				1	2	3	4	5	PH	6	7	PH	8	9	10	PH	11
1 TESTIGO	MACHO	WEIMARANER	1	6	NR	13	17	20		24	27		30	34			
3 TESTIGO	MACHO	WEIMARANER	1	6	NR	15	18	21		25	28		32	35	39	40	46
2 CONTROL POSITIVO	MACHO	WEIMARANER	1	6	11	15	18	21	22	25	28	29	32	35	39	40	46
4 CONTROL POSITIVO	MACHO	WEIMARANER	1	6	11	15	18	21	22	25	28	29	32	35			
6 CONTROL NEGATIVO	MACHO	WEIMARANER	4	8	11	14	18	21		25	28		32	35			
18 CONTROL NEGATIVO	MACHO	CRIOLLO	1	7 D E F U N C I O N													
7 933J	HEMBRA	WEIMARANER	1	6	9	13	20	NR		27	30		34				
16 933J	MACHO	CRIOLLO	0.9	6	11	14	18	22		NR	29		33	36			
9 933W	HEMBRA	WEIMARANER	1	8	12	19	22	26		29	33						
15 933W	MACHO	CRIOLLO	5	8 11 14 D E F U N C I O N													
14 933	MACHO	CRIOLLO	3	8	11	14	18	22		26	29		33	36			
17 933	MACHO	CRIOLLO	3	D E F U N C I O N													
19 933	MACHO	CRIOLLO	4	7 D E F U N C I O N													
11 H30	MACHO	COLLIE	3	6	10	13	16	20		24	28		31	35			
12 H30	MACHO	CRIOLLO	3	6	10	13	16	20		24	28		31	35			

• Los datos son anotados en días después de la operación.

NR No Realizado

• Representa el muestreo posterior a la hemólisis realizada en los animales del grupo control positivo.

TECNICA QUIRURGICA.

La técnica quirúrgica elegida que se realizó en los perros fué una modificación de la resección del intestino y anastomosis abierta termino-terminal descrita por Annis; J.R. y Allen; A.R. (2). El área intestinal que se reseccionó fue del duodeno, debido a que se considera una región aséptica lo que le evitaría la competencia e interferencia bacteriana a las cepas de E. coli inoculadas.

Para cada intervención los animales fueron sometidos a dieta total 24 horas previas a la misma. Se utilizó como preanestésico clorhidrato de propiomazina* a una dosis de 3 mg/10 kg de peso por vía intravenosa (IV). Posteriormente se indujo a la anestesia general mediante el uso de pentobarbital sódico** a una dosis de 14 mg/kg por vía IV.

Una de vez delimitada y rasurada la zona de operación los animales fueron cateterizados con un Punzocat*** calibre 20 y un equipo de venoclisis**** para la administración de Boclisil en solución salina***** durante el tiempo en que el animal estuvo

- * Combelen, Bayer.MR.
- ** Anestesal. Smith-Kline.MR.
- *** Terumo.MR.
- **** Venoset.MR.
- ***** ABBOT.MR.

sometido a la cirugía con el fin de reconstituir el líquido perdido y para introducir anestésico o medicamentos necesarios en el transcurso de la operación.

Después de realizada la asepsia de la zona de operación, se efectuó una incisión medial de aproximadamente 10 cm de longitud, cranealmente a la cicatriz umbilical. Se expuso la zona del duodeno, delimitándose la zona a reseccionar y se hicieron las ligaduras de vasos sanguíneos necesarias para dejar con irrigación el segmento seleccionado y la anastomosis intestinal con material de sutura Dexon calibre 2-0. Posterior a esto se procedió a cortar el área seleccionada y el segmento se cubrió con gasas humedecidas en Solución Salina Fisiológica (SSF) estéril durante el tiempo en que se realizó la anastomosis. La anastomosis se realizó, comenzando en el borde antimesentérico y en el interior de luz intestinal, iniciando con un surgete continuo hasta donde fue posible, después se continuó con un patrón de sutura de Connell y se reforzaron ambas suturas con patrón de Cushing. Se corroboró que no existieran fugas y que el paso del contenido intestinal fuera el adecuado.

En seguida se lavó el segmento intestinal con aproximadamente 100 ml de SSF estéril y se cerró por ambos lados con patrón de sutura de Connell y Cushing como se describe en la literatura (2). Antes de finalizar la oclusión del segmento, en los animales que así lo requirieron se inocularon 2 ml del cultivo correspondiente de bacterias de E. coli. En todos los pasos de cirugía intestinal se utilizó material de sutura Dexon calibre 3-0. Terminado

este procedimiento se adosó el segmento reseccionado a la pared abdominal por medio de puntos de aislamiento en "U". La cavidad abdominal se cerró por el procedimiento rutinario (2).

Al finalizar la cirugía, a todos los perros se les administró por vía intravenosa a través de la venoclisis, Difenhidramina hidrociorhidrica* a una dosis de 10 mg/10 kg y Dipirona** a una dosis de 50 mg/kg.

Como postoperatorio se aplicó también de ser necesario Neo-Melubrina y se realizó una desinfección local de la herida con agua oxigenada y/o licor de forge reforzada con Negasunt de acuerdo a las condiciones de la herida. En los perros que presentaron más complicaciones en la herida se les aplicó en forma local pomada Recoveron con Neomicina.

HEMOLISIS

A los animales del grupo 2 (control positivo) se les provocó una hemólisis intravascular por choque osmótico al eritrocito, en tres ocasiones de la siguiente manera:

- la Hemólisis.- 3a Semana posoperatorio - Los animales fueron cateterizados con equipo punzocat*** calibre 20 y un equipo de venoclisis espe-

* Histafin, Loeffler. MR.
** Neo-Melubrina, Hoechst. MR.
*** Terumo. MR.

cial para transfusiones; la sangre se recibió gota a gota y con agitación constante en 100 ml de agua bidestilada estéril. Fueron recolectados aproximadamente 50 ml de sangre del animal. Realizada la hemblisis, la sangre fue reincorporada por vía intravenosa (IV).

- 2a Hemblisis.- 4a Semana postoperatorio - Fue provocada por la administración de 150 ml de agua bidestilada estéril por vía IV.
- 3a Hemblisis.- 6a Semana postoperatorio - El mismo procedimiento anterior.

TOMA DE MUESTRAS E INTERVALO DE MUESTREO

Para llevar a cabo las determinaciones de laboratorio necesarias se tomaron muestras de sangre con anticoagulante y sin anticoagulante, orina, así como las muestras del contenido del segmento intestinal.

- Sangre: Se muestreó antes de la cirugía y posteriormente cada 3-4 días hasta el término del experimento. En los animales hemblizados se realizó un muestreo posterior a la misma. Para la obtención de la muestra se puncionó a nivel de la vena cefálica utilizando jeringa estéril de 10 ml* con aguja de calibre 20.

* Terumo y B-D. MR.

Se recolectó en tubos de ensaye limpios y secos con o sin anti-coagulante. Para los tubos de sangre con anticoagulante se depositó en el fondo sales de Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) disódico, a una dosificación de 1 mg/ml, tomando las precauciones recomendadas, se adicionaron 5 ml de sangre mezclandola suavemente con el anticoagulante. Para realizar las pruebas se separó en otro tubo la cantidad mínima y necesaria para la Biometría Hemática y del resto se obtuvo el plasma inmediatamente por medio de una centrifuga clinica a 1000 r.p.m. durante 10-15 minutos.

Para la obtención del suero, se depositó aproximadamente 6 ml de sangre en cada tubo, se colocaron en posición horizontal y se dejaron reposar a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo y la retracción del mismo. En algunos casos los tubos se incubaron a 37°C para la aceleración del proceso. El suero se separó del coágulo y se depuró por medio de centrifugación.

- Orina: Se realizó un muestreo previo a la cirugía y 5 muestreos posteriores a la misma con un intervalo de una semana entre ellos. Para obtener la muestra se sondeo a los animales con una sonda para alimentación infantil* tal y como se describe en la literatura (2) o se obtuvo la orina por micción directa según las condiciones de manejo. No se utilizaron conservadores ni preservadores.

* Dreno. MR.

- Contenido Intestinal: Para obtener la muestra se puncionó el segmento con jeringa estéril de 5 ml y aguja estéril calibre 18* a través de cavidad abdominal en la zona referida que ocupaba el mismo, previamente rasurada y desinfectada. Dicho procedimiento se efectuó con intervalos de una semana hasta el final del estudio.

PRUEBAS DE LABORATORIO

- Biometría Hemática: A las muestras de sangre completa, se les realizaron las siguientes pruebas utilizando los procedimientos rutinarios (40).

Hematocrito: Empleando el método de microhematocrito.

Conteo de glóbulos rojos y glóbulos blancos: Utilizando la técnica del hemocitómetro.

Hemoglobina: Mediante la técnica de Cianometahemoglobina.

Conteo diferencial leucocitario: por medio de un frotis sanguíneo teñido con colorante de Wright.

Conteo plaquetario directo: Utilizando la técnica del hemocitómetro.

- Hemoglobina Plasmática: La preparación de los reactivos, la realización de la técnica así como la obtención de resultados se hizo siguiendo la técnica de Benzidina citada por Sonnenwirth, A.C. (39) y consistió en:

* Terumo. MR.

REACTIVOS

1.- Estandar de Hemoglobina. Solución base.

- a) Se diluyeron 2 ml de sangre entera de canino con 8 ml ron durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- b) Se adicionaron 0.1 ml de la dilución en 5 ml de solución de Drabkin y se determinó el contenido de Hemoglobina leyendo a 540 nm, interpolando en la curva previamente realizada para Cianometahemoglobina. Se multiplicó por 0.203 para obtener la concentración real de hemoglobina en dilución. Mediante este resultado se diluyó la solución obtenida anteriormente hasta tener exactamente 100 mg de hemoglobina por 100 ml.
- c) Realizada la dilución los estándares se mantuvieron en viales de un mililitro a 0°C.

2.- Reactivo de Benzidina. Se disolvieron 10 mg de Benzidina base* en 1 ml de ácido acético glacial** Debido a que la solución sólo es estable en refrigeración aproximadamente por una semana se preparaba únicamente la cantidad necesaria para realizar determinado número de pruebas.

3.- Mezcla Benzidina Estandar.

- a) Se preparó un estándar de 1mg/dl de Hemoglobina diluyendo la solución base 1:100 con agua destilada.

* Sigma Chemical Co. MR.

** Merck, México. MR.

b) Se mezcló el estandar en proporción 1:1 con el reactivo de Benzidina.

4.- Mezcla Blanco Benzidina. Se mezcló agua destilada en proporción 1:1 con el reactivo de Benzidina.

5.- Peróxido de hidrógeno 3%.

6.- Solución de Acido Acético 3.3 M. Se diluyeron 200 ml de ácido acético glacial* a un litro con agua destilada.

7.- Solución de Drabkin. Se utilizó un reactivo comercial ya preparado**

TECNICA

Para cada determinación se utilizaron tres tubos. El plasma se diluyó 1:2 con agua destilada. Si los valores obtenidos eran altos se usó una dilución mayor. El procedimiento fue el siguiente:

* Merck , México. MR.

** HYCELL. MR.

	Problema	Estandar	Blanco
	(ml)	(ml)	(ml)
Plasma diluido	0.25	0.25	0.25
Peróxido de hidrógeno	--	0.25	0.25
Reposar 10 minutos			
R. Blanco Benzidina	0.5	--	0.5
R. Estandar Benzidina	--	0.5	--
Peróxido de hidrógeno	0.25	--	--
Mezclar y reposar 15 minutos			
Acido acético 3.3 M	10.0	10.0	10.0

El estandar y el problema se leyeron en Absorbancia (As) contra blanco a 520 nm.

CALCULOS

$As_{\text{Problema}} \times 1 \times D = \text{Hemoglobina mg/dl}$ Donde D es el factor de dilución.
 As_{Estandar}

- Determinación Cuantitativa Rápida de Haptoglobina

Sérica: La medición de esta proteína se efectuó siguiendo la técnica y la preparación de reactivos que a continuación se describe tal y como lo indica Sonnenwirth, A.C. (39).

REACTIVOS

1.- Amortiguador de Formato 0.5 M pH 3.7

a) Se preparó una solución 1 M de ácido Fórmico * adicionando 43.5 ml del reactivo grado ácido (88%) a un litro con agua destilada.

b) Se preparó una solución 1 M de NaOH** disolviendo 20 g. de NaOH y aforando a 500 ml con agua destilada.

c) En un matraz volumétrico de un litro se agregaron 500 ml de ácido Fórmico 1 M, 250 ml de NaOH 1 M y 150 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 3.7 con NaOH y se aforó a un litro con agua destilada.

2.- Solución de NaCl 0.15 M: Se disolvieron 9 g. de NaCl y se aforó a un litro con agua destilada.

3.- Solución de Cianometahemoglobina 60 mg/dl: Se adicionó ción de hemoglobina en el espectrofotometro a 540 nm, si era necesario se diluyó para tener exactamente una concentración de 60 mg/dl. Esta solución se preparó inmediatamente antes de emplearse.

* Mallinckrodt Chemical Works. MR.

** Técnica Química. MR.

TECNICA

Tubo Problema - 1.8 ml de solución de NaCl.

- 0.2 ml de suero problema.
 - 1.0 ml de solución de Cianometahemoglobina.
- Se mezcló y dejó reposar 10 minutos.
- 2.0 ml de amortiguador de formato.

Tubo Blanco - 1.8 ml de solución de NaCl.

- 1.0 ml de solución de Cianometahemoglobina.
 - 2.0 ml de amortiguador de formato.
- Se mezcló y dejó reposar 10 minutos.
- 0.2 ml de suero problema.

CALCULOS

Dejando ambos tubos reposar durante una hora a temperatura ambiente, se leyó el problema contra blanco en el espectrofotómetro a 407 y 380 nm.

$(A_{407} - A_{380}) \times 455 =$ Haptoglobina mg/dl medidos por equivalentes de Cianometahemoglobina.

- Urea Sérica: Se realizaron las pruebas utilizando un Dirección General de Reactivos de la Secretaría de Salud. Los reactivos fueron probadas mediante la curva de calibración respectiva. La técnica empleada fue la de Ureasa y el método se efectuó de la siguiente forma:

- a) Se diluyó el suero problema en proporción 1:10, colocando en un tubo 0.2 ml de la dilución.
- b) Se adicionaron 2 gotas de Ureasa.
- c) Se incubaron a 37°C durante 15 minutos.
- d) Se agregaron 2.0 ml de reactivo de fenol y 2.0 ml de reactivo de hipoclorito alcalino.
- e) Se mezclaron e incubaron a 37 C durante 15 minutos.
- f) Se agregaron 6.0 ml de agua destilada.

Se leyó contra de reactivos a 550 nm determinando la concentración al interpolar en la curva de calibración previamente realizada.

- Examen General de Orina: Se realizó el examen físico, químico y microscópico de rutina (40). La gravedad específica fue determinada por medio del refractómetro de Goldberg. El examen químico se efectuó utilizando tiras ractivas N-Multistix* siguiendo las recomendaciones del instructivo anexo.

* Laboratorios Miles. MR.

- Recuento bacteriológico: A todas las muestras de contenido intestinal se les realizaron pruebas de pureza; sembrandolas en medios de agar sangre y agar Mac Conkey, los cuales fueron incubados a 37°C durante 24 horas para una posterior identificación de las colonias. Para el recuento bacteriológico del contenido intestinal se le practicaron diluciones decimales en solución salina las cuales fueron sembradas en cajas con agar nutritivo, se mantuvieron en incubación a 37°C durante 24 horas y al término de la misma se contaron las colonias con un contador automático.

- Cuantificación de Citotoxinas: El contenido intestinal fue diluido decimalmente con amortiguador de Fosfatos y cada dilución fue inoculada en microplacas conteniendo un cultivo de células Vero a un 50% de confluencia. Las microplacas se incubaron 24-72 horas en atmósfera de CO₂ y se observó el efecto citopático por medio de un microscopio.

- Necropsia: Al término del experimento los perros fueron sacrificados con sobredosis de Pentobarbital sodico minutos antes de practicarles la necropsia, la cual fue realizada utilizando la técnica descrita por Gazquez; D.A. (14), sólo que al exponer la cavidad abdominal se realizó una incisión paramedial izquierda. En ese momento fueron tomadas muestras de hígado, riñón y asa duodenal ligada, para ello se utilizaron guantes estériles fueron depositadas en frascos estériles para su estudio bacteriológico así mismo se obtuvo muestra del contenido del segmento intestinal con jeringa y aguja estériles. Posteriormente se

colectaron muestras representativas de hígado, riñón, segmento intestinal y del Área de anastomosis intestinal para estudio histopatológico. Al finalizar este proceso se continuó con la necropsia de rutina.

R E S U L T A D O S

Los resultados de las pruebas sanguíneas obtenidas de la evaluación preoperatoria realizada en los animales, se agrupan en el CUADRO No 2. Los valores estadísticos; Media (X) y Desviación estandar (S), se calcularon de acuerdo a la bibliografía (10) considerando n=15.

La técnica quirúrgica empleada resultó ser adecuada para los fines de nuestro estudio, ya que los animales sobrevivieron a la misma, no hubo fugas ni estenosis en el área anastomosada (excepto en el perro No. 3, de acuerdo a los resultados de la necropsia). El segmento intestinal no presentó fugas, se mantuvo viable y se adosó perfectamente a la cavidad abdominal. Además de que no existieron cambios conductuales en los animales.

El problema que se presentó en la mayoría de los animales fue la infección externa de la herida y pérdida de los puntos con el subsecuente retardo en la cicatrización de la misma. Debido a esto se intensificó la desinfección local diaria de la zona y se buscó una cicatrización por segunda intención aplicando productos expofeso. En algunos casos fue necesario reavivar los bordes de la herida y proceder a reconstruir la zona para evitar una posible eventración.

BIOMETRIA HEMATICA.

Los resultados de las pruebas de Hematocrito, Hemoglobina y Conteo de glóbulos rojos de las Biometrías Hemáticas realizadas a los animales en experimentación posterior a la cirugía se muestran en el CUADRO No. 3.

Para comparaciones posteriores se calcularon los intervalos de los datos de la fórmula blanca en condiciones normales. Para dicho cálculo se toma en cuenta la $X \pm 1 S$ de los valores preoperatorio arrojando los siguientes resultados.

Globulos blancos	9.7 - 15.5 miles/mm ³
Linfocitos	14 - 24 %
Monocitos	2 - 6 %
Neutrófilos Seg.	63 - 75 %
Neutrófilos Banda	0 - 2 %
Eosinófilos	2 - 12 %

Como criterio, tomado en forma arbitraria para este trabajo, para determinar el grado de leucocitosis se eligieron los siguientes rangos :

Ligera	15.5 - 20.5 miles/mm ³
Moderada	20.5 - 25.5 " "
Severa	> 25.5 " "

De acuerdo a lo anterior, 10 animales presentaron en la primera mitad del experimento una leucocitosis con desviación a la izquierda, siendo esta leucocitosis ligera en 4, moderada en 5 y a severa en un animal. Los 5 perros restantes no evidenciaron leucocitosis pero sí una leve desviación a la izquierda.

Durante la segunda mitad del trabajo, en los perros que conformaron el grupo testigo, la leucocitosis en el No. 1 evolucionó de moderada a ligera aunque sin desviación a la izquierda y pasó de severa a moderada aún con desviación a la izquierda marcada en el No. 3. En el animal No. 6 (grupo control negativo) los valores leucocitarios fueron normales durante este periodo. Del grupo control positivo en el animal No. 2 desapareció la leucocitosis y en su pareja (perro No. 4) la leucocitosis fue de moderada con desviación a la izquierda a una ligera sin desviación a la izquierda. Para los cáninos No. 7 y 16 (cepa 933J) en el transcurso de este lapso los niveles leucocitarios fueron normales, el No. 9 (cepa 933W) continuó con ligera leucocitosis y se desarrolló también una ligera leucocitosis en el No. 14 (cepa 933), las cuales no pudieron ser comparadas con sus compañeros ya que estos murieron. El perro No. 11 no desarrolló leucocitosis posterior a la intervención quirúrgica, contrastando con el No. 12 que de estar ausente en la primera mitad pasó a ser moderada en la segunda estos animales fueron inoculados con cepa H30.

Los resultados de los conteos plaquetarios efectuados en los perros durante el periodo postoperatorio no evidenciaron trombo-

citopenia (en base al intervalo calculado de $(\bar{X} \pm 1\sigma)$ a partir de los resultados basales tomados del CUADRO No. 2), excepto en el animal No. 9 que durante la primera mitad de este periodo que abarca hasta el día 22 posterior a la inoculación con la cepa 933W, mostró una baja en sus conteos plaquetarios.

HEMOGLOBINA PLASMÁTICA, HAPToglobINA SÉRICA Y UREA SÉRICA.

Los valores obtenidos en las pruebas de Hemoglobina plasmática, Haptoglobina sérica y Urea sérica realizadas después de la cirugía se agrupan en los CUADROS No. 4, 5 y 6 respectivamente. La representación gráfica de los resultados de las pruebas mencionadas para los perros No. 2 y 4 (Control positivo) se encuentra en la FIGURA No. 1. De igual manera para los perros No. 7 y 16 (cepa 933J) corresponde la FIGURA No. 2 y los animales 9 y 15 (cepa 933W) y 14 (cepa 933) se presentan en la FIGURA No. 3. La FIGURA No. 4 ilustra las pertenecientes a los animales No. 11 y 12 (cepa H30). El intervalo normal utilizado en las gráficas se calculó mediante un promedio de las Medias y Desviación estándar de los caninos No. 1, 3 y 6 (grupo testigo y control negativo) a partir de los valores obtenidos en estos animales durante el periodo posterior a la intervención quirúrgica.

URIANALISIS.

En cuanto a los resultados del Examen General de Orina practicado antes de la intervención, 8 de los animales presentaron un pH entre 6.0-6.5 y 7 entre 7.0-7.5. Once perros mostraron proteinuria de 30 mg/dl y trazas de la misma en los 4 perros res-

tantes. Once de los perros evidenció cristaluria en cantidad moderada a abundante, siendo los cristales de fosfato triple los más observados en las muestras. Las células de descamación en cantidad moderada fueron encontradas en 11 de ellos y sólo hubo escasas células de transición en un 3. Sólo 8 caninos presentaron escasos cilindros hialinos y granuloso.

Respecto a los Urianálisis efectuados después de la resección intestinal tenemos que la mayoría durante este transcurso del trabajo presentaron un rango de pH entre 6.0-7.5, excepto en el tercer muestreo de los animales No. 3 (testigo) y 7 (cepa 933J) y en el cuarto del No. 9 (933W), los cuales tuvieron un pH de 8.0. A partir del segundo muestreo en el animal No. 12 (cepa H30), el valor de pH fue de 8.5 hasta el término del experimento. Casi la totalidad del grupo presentó una proteinuria desde trazas a 30 mg/dl, excepto en las hembras No. 7 (cepa 933J) y 9 (933W) que en el último muestreo alcanzaron una proteinuria de 100 mg/dl y en el macho No. 16 (cepa 933J) en el cual no se encontró proteinuria o sólo se encontró trazas de ésta. El canino No. 12 (cepa H30) en sus muestreos 2 y 5 mostró una proteinuria de más de 2g/dl y de 100 mg/dl respectivamente. Se detectaron 4 unidades Erlich de Urobilinógeno en el quinto muestreo de los perros No. 2 y 4 (controles positivos) y en el segundo muestreo del No. 12 que además presentó un valor moderado de bilirrubina. La cristaluria estuvo presente en todos los perros, siendo menor en las hembras, y los cristales observados fueron los de fosfato triple, ácido úrico, fosfatos y uratos amorros, en orden de importancia y correspondiendo al pH de la muestra. Sólo se encontraron escasas

células de descamación, siendo más abundantes en las hembras, y escasas células de transición en todos los animales en la primera mitad de este lapso, excepto en el perro No. 11 en el que hubo abundantes leucocitos y escasos eritrocitos y en el perro No. 12 donde también se hallaron bacterias, moderados leucocitos, células de transición y escasos eritrocitos, ambos fueron inoculados con la cepa H30. En la segunda mitad, el canino No. 1 (testigo) no mostró celularidad y los No. 3 (testigo) y 6 (control negativo) continuaron igual que en el comienzo del postoperatorio. En los perros No. 2 y 4 (control positivo) se vieron abundantes células renales y moderadas células de transición. Las hembras No. 7 (933J) y 9 (933W) presentaron abundantes leucocitos, moderados eritrocitos y células de transición y renales. Los machos No. 11, 14 (933) y 16 (933J) evidenciaron moderados leucocitos y escasas células renales. En el animal No. 12 los leucocitos y las células de transición fueron abundantes, encontrándose también bacterias en el sedimento.

Distintos tipos de cilindros se observaron en casi todo el grupo durante el experimento; en diferentes tiempos y en cantidades variables. Al principio del estudio se encontraron escasos cilindros hialinos sólo en los animales No. 7 (933J), 9 (933W) y 14 (933). Hacia el final se observaron abundantes cilindros epiteliales en los perros No. 2, 4, 7 y 9. De igual manera se presentaron escasos cilindros granulosos en los caninos No. 3, 6, 14 y 16. En el transcurso de todo el periodo postoperatorio los animales No. 11 y 12 mostraron escasos cilindros hialinos y grá-

nulosos, como en el análisis preoperatorio.

CUADRO CLINICO.

Como antecedentes clinicos los animales tuvieron en su mayoria buena recuperaci3n y se encontraban en buenas condiciones. S3lo el animal No. 3 (testigo) present3 un cuadro de emaciaci3n progresiva. Despu3s de la primera hem3lisis el perro No. 4 mostr3 inflamaci3n en el vientre con eritema cutaneo y fiebre de 40-41°C. Se trat3 con Histafin y Neo-Melubrina cediendo al mismo. Se diagnostic3 alergias por picadura de insecto. En la zona afectada se form3 a los tres d3as un absceso que se debrid3 y trat3 localmente. Las hembras No. 7 (cepa 933J) y 9 (cepa 933W) desarrollaron diarrea caf3 hemorr3gica en los primeros cuatro d3as postinoculaci3n y a los 28 d3as la No. 9 abort3. Se detectaron signos de aborto a los 34 d3as postinoculaci3n (fecha del sacrificio) en la hembra No. 7. Los animales No. 14, 17 y 19 (cepa 933) manifestaron v3mito verdoso en los primeros cuatro d3as posteriores a la intervenci3n quir3rgica, adem3s el No. 17 present3 diarrea sanguinolenta. Los animales No. 17, 19 (cepa 933) y 18 (cepa k12) murieron una semana despu3s de haber sido operados y el No. 15 (cepa 933W) a los quince d3as en los cuales se mostr3 demasiado deprimido, a este perro no se le pudo practicar la necropsia.

Los resultados de las necropsias realizadas en los testigos (perros No. 1 y 3) revelaron que la cavidad abdominal no present3 cambios, la zona de anastomosis se encontr3 en buenas condiciones y el segmento desarroll3 atrofia en el No. 1, adem3s los ri3ones mostraron una ligera nefritis intersticial multifocal agu-

da. En contraste en el perro No. 3, la cavidad abdominal mostró peritonitis fibrinosa subaguda moderada, se observó un absceso de aproximadamente 10 cm de diámetro en la región anastomosada que involucraba las asas intestinales vecinas y parte del hígado.

Los animales control positivo (animales No. 2 y 4) no evidenciaron cambios en cavidad abdominal ni en la región duodenal intervenida sólo hubo atrofia del segmento intestinal. En el perro No. 2 se encontró Nefrosis moderada.

En cuanto a los perros Control Negativo, el No. 6 tuvo una respuesta similar a los control positivo a nivel intestinal y el No. 16 sufrió una peritonitis fibrinosa difusa severa y una estrangulación a nivel de colon.

Los caninos inoculados con la cepa 933J (No. 7 y 16) tuvieron peritonitis fibrinopurulenta localizada moderada, en la anastomosis no hubo cambios y el segmento se encontró dilatado por un contenido purulento café-verdoso de olor fétido. Existían adherencias entre duodeno, segmento intestinal e hígado. Los riñones del No. 7 tenían Nefrosis moderada y en el No. 16 Nefritis intersticial crónica moderada. Se encontró maceración fetal en el No. 7 y parasitosis intestinal en el No. 16.

Los hallazgos de la hembra No. 9 fueron parecidos a los anteriores a nivel de cavidad abdominal y digestiva además presentó Nefrosis severa y Endometritis catarral moderada.

De los perros inoculados con la cepa 933 en el No. 14, a nivel de omento mayor se observaron múltiples coágulos sanguíneos entre 0.5-2.0 cm de diámetro. El segmento intestinal contenía exudado purulento carú-verdoso de olor fétido. Los riñones tenían Nefritis intersticial crónica moderada. Además el bazo presentó 6 infartos entre 1-3 cm de diámetro, los ganglios mesentéricos estaban severamente congestionados y hubo parasitosis ligera. Los animales No. 17 y 19 desarrollaron gangrena húmeda con liclefación del segmento intestinal, peritonitis hemorrágica aguda severa, enteritis y colitis hemorrágica. Todas las vísceras abdominales estaban adheridas y congestionadas severamente. Los riñones adquirieron una coloración negra.

El perro No. 11 no presentó ningún cambio significativo, sólo el segmento dilatado levemente por un exudado verdoso fétido. El animal No. 12 tuvo peritonitis fibrinosa ligera, anastomosis en buenas condiciones y el segmento intestinal dilatado por un exudado con las mismas características del anterior. En aparato urinario se encontró Pielonefritis y Cistitis hemorrágica severa.

Los hallazgos histopatológicos más relevantes se incluyen en el CUADRO No. 7.

Referente a los exámenes de bacteriología los resultados se muestran en el CUADRO No. 8, sólo se incluyeron los correspondientes a las muestras del Contenido del segmento intestinal obtenidas en la necropsia, se aislaron E. coli en la mayoría de los

especímenes tomados durante el transcurso del experimento en los animales inoculados. De los animales del grupo Testigo y Control positivo no se aislaron bacterias.

CUADRO 2

VALORES DE LAS PRUEBAS EN SANGRE REALIZADAS A LOS ANIMALES DE ESTUDIO
ANTES DE LA CIRUGIA

No.	Ht* (%)	Hb g/dl	GR 10 /mm ³	GB 10 /mm ³	L	CONTEO DIF. (%)				P.P. g/dl	PLAQ. 10 /mm ³	Hb/P mg/dl	Hp/s mg/dl	UREA mg/dl
						M	NS	NB	EO					
1	49	17.3	9.30	20.2	29	4	60	0	7	7.8	120	4.2	59	44
3	60	16.6	6.57	15.8	22	5	69	2	2	7.6	140	6.3	64	38
2	49	19.3	8.12	10.0	18	6	72	1	4	8.0	100	2.9	91	26
4	55	17.6	5.97	11.0	20	8	69	2	1	8.0	160	4.9	45	36
6	52	18.0	7.10	11.8	24	4	70	2	0	7.8	130	4.9	105	38
18	51	20.0	7.55	9.6	28	4	60	2	6	9.0	230	5.5	50	32
7	52	17.3	6.72	12.1	14	3	81	0	2	7.6	110	5.5	40	30
16	37	13.3	5.54	8.8	15	2	78	1	5	8.4	100	5.6	64	34
9	50	17.0	5.32	11.7	22	4	72	1	1	8.0	110	3.1	36	32
15	41	15.3	7.22	15.3	10	2	73	2	13	8.1	260	5.5	77	23
14	54	20.0	7.17	11.2	15	2	69	0	14	8.2	190	15.5	50	35
17	54	20.0	7.41	12.4	20	2	64	1	12	7.5	210	10.0	41	60
19	51	17.3	5.97	12.7	24	5	63	1	7	7.0	220	3.0	114	32
11	41	18.0	7.54	15.0	15	2	68	2	13	8.5	410	2.5	82	20
12	40	18.0	6.52	11.7	17	4	65	1	13	8.1	230	3.3	50	44
\bar{X}	49	17.6	6.93	12.6	19	4	69	1	7	8.0	181	5.5	64	35
5	6.4	1.8	1.03	2.9	5	2	6	1	5	0.5	83	3.3	24	10

* Corresponden a las abreviaturas de las pruebas realizadas. Ht=hematocrito
Hb=hemoglobina GR=globulos rojos GB=globulos blancos L=linfocitos
M=monocitos NS=neutrófilos segmentados NB=neutrófilos en banda
EO=eosinófilos P.P.=proteinas plasmáticas Hb/P=hemoglobina plasmática
Hp/S=haptoglobina serica.

CUADRO 3

VALORES DE LAS PRUEBAS DE LA SERIE ROJA EN SANGRE OBTENIDOS EN LOS ANIMALES DE ESTUDIO DURANTE EL EXPERIMENTO

No.	PREOPERATORIO	POSTOPERATORIO (NUMERO DE MUESTRO)													
		1	2	3	4	5	PH	6	7	PH	8	9	10	PH	11
Ht(%) Hb(g/dl) GR(mill/mm3)	49.00 17.30 9.30	*34.00 *13.60 *04.76	NR NR NR	44.00 *11.60 *05.00	*39.00 15.60 *04.75	43.00 15.60 6.09		NR NR NR	45.00 15.00 *05.25		44.00 15.30 *04.79	46.00 15.00 6.51			
Ht 3 Hb GR	60.00 16.60 6.57	43.00 15.00 6.75	NR NR NR	*31.00 *11.60 *04.75	*29.00 *10.60 *04.38	*41.00 16.30 6.30		*39.00 *13.30 *05.08	*40.00 *14.00 *04.87		*37.00 *13.30 *05.52	NR NR NR			
Ht 2 Hb GR	49.00 17.30 8.12	45.00 15.00 6.87	*29.00 *13.00 *04.40	*32.00 15.00 6.19	47.00 15.00 7.24	*41.00 15.30 7.27	42.00 *13.00 6.76	49.00 16.30 8.62	49.00 *13.00 6.40	*37.00 *13.60 *04.27	45.00 15.30 6.94	*40.00 *13.00 *05.19	*36.00 *12.30 *04.86	*35.00 16.30 7.15	*40.00
Ht 4 Hb GR	55.00 17.60 5.97	44.00 15.00 7.80	47.00 *13.30 7.38	*35.00 16.60 8.01	50.00 17.00 6.68	*41.00 16.60 6.21	42.00 *13.00 6.76	47.00 18.00 8.42	*40.00 *13.3 *04.72	*41.00 *13.00 *04.61	*40.00 *12.60 *04.79	NR NR NR	*30.00 *11.60 *03.98	*36.00 *12.60 *04.61	*38.00 16.60 *05.43
Ht 6 Hb GR	52.00 18.00 7.10	47.00 17.30 9.30	44.00 16.00 8.01	40.00 16.60 5.74	*35.00 *11.00 *04.69	*34.00 *12.30 *04.03		NR NR NR	*35.00 *14.60 *03.97		*37.00 *14.60 *04.05	42.00 15.00 5.83			
Ht 16Hb GR	51.00 20.00 7.55	51.00 15.00 *05.07	D	E	F	U	N	C	I	O	N				
Ht 7 Hb GR	52.00 17.30 6.72	*40.00 15.00 *04.84	42.00 *13.60 *04.65	*40.00 *13.00 *04.66	*30.00 *10.00 *04.02	NR NR NR		*30.00 *12.00 *03.59	*28.00 *10.60 *02.95		*28.00 *10.60 *02.98				
Ht 16Hb GR	*37.00 *13.30 *05.54	*35.00 *14.00 *04.87	*39.00 *12.70 *05.75	*40.00 *13.30 *04.52	*40.00 *14.30 *04.78	*32.00 *11.70 *04.34		NR NR NR	NR NR NR		*35.00 *11.60 *04.32	*34.00 *10.60 *03.68			
Ht 9 Hb GR	50.00 17.00 *05.32	42.00 17.20 5.97	*41.00 16.00 *05.05	*33.00 *11.60 *04.52	*30.00 *10.00 *03.77	*32.00 *12.00 *03.60		*30.00 *09.33 *04.12	*28.00 *11.00 *03.04						
Ht 15Hb GR	41.00 15.30 7.22	*31.00 14.30 *03.97	45.00 15.30 7.39	44.00 15.00 *05.24	D	E	F	U	N	C	I	O	N		

CUADRO 3
CONTINUACION

No.	PREOPERATORIO	POSTOPERATORIO (NUMERO DE MUESTRO)													
		1	2	3	4	5	PH	6	7	PH	8	9	10	PH	11
Ht	54.00	NR	43.00	45.00	*41.00	45.00		42.00	44.00		45.00	47.00			
14Hb	20.00	NR	15.00	16.30	15.00	15.00		15.00	15.00		15.60	15.00			
GR	7.17	NR	*04.37	*04.11	*04.01	5.99		*04.80	5.72		*04.69	5.24			
Ht	54.00														
17Hb	20.00	D	E	F	U	N	C	I	O	N					
GR	7.41														
Ht	51.00	42.00													
19Hb	17.30	15.00	D	E	F	U	N	C	I	O	N				
GR	5.97	*04.69													
Ht	41.00	45.00	42.00	43.00	43.00	50.00		45.00	45.00		45.00	47.00			
11Hb	18.00	18.00	16.60	15.00	15.00	15.00		15.60	14.30		15.00	15.00			
GR	7.54	7.03	7.01	*05.53	*05.16	7.84		5.91	*05.50		*05.26	*05.18			
Ht	*40.00	45.00	36.00	NR	*29.00	*25.00		*27.00	*27.00		*26.00	*27.00			
12Hb	18.00	16.30	*13.00	NR	*10.00	*08.30		*10.30	*08.30		*08.30	*08.30			
GR	6.52	5.96	*03.89	NR	*04.24	*02.97		*03.24	*02.72		*02.96	*03.26			

PH. Representa el muestreo posterior a la hemólisis realizada en los animales del grupo control positivo

* Corresponden a las abreviaturas de las pruebas realizadas
Ht=hematocrito Hb=hemoglobina GR=glóbulos rojos

~ Representan los valores que se encuentran por debajo del intervalo normal preoperatorio

NR No realizado

CUADRO 4.

RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS DETERMINACIONES DE HEMOGLOBINA PLASMÁTICA
EN LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

NO. TRATAMIENTO	PREOPERATORIO	POSTOPERATORIO						NUMERO DE MUESTREO							
		1	2	3	4	5	PH	6	7	PH	8	9	10	PH	11
1 TESTIGO	4.2	13.0	NR	5.8	NR	49.1		NR	4.5		10.9	10.7			
3 TESTIGO	6.3	14.0	NR	4.7	18.0	4.5		33.4	7.8		NR	NR			
2 CONTROL (+)	2.9	5.1	3.7	4.7	5.6	8.7	4.6	109.0	52.9	6.2	52.0	19.5	45.7	6.6	4.9
4 CONTROL (+)	4.9	10.5	6.4	6.0	5.0	19.2	8.0	48.2	5.9	3.6	5.3	19.2	150.0	3.1	23.7
6 CONTROL (-)	4.9	3.7	28.0	8.0	7.4	3.7		NR	6.0		44.4	15.2			
18 CONTROL (-)	5.5	28.3	D	E	F	U	N	C	I	O	N				
7 (933J)	5.5	5.3	40.0	6.0	NR	NR		12.5	24.6		65.8				
16 (933J)	5.6	3.1	5.6	NR	14.0	5.8		NR	NR		3.3	4.0			
9 (933W)	3.1	10.0	19.2	NR	122.0	24.8		13.8	3.8		8.5				
15 (933W)	5.5	233.3	21.7	19.0	D	E	F	U	N	C	I	O	N		
14 (933)	15.5	10.5	3.5	6.6	2.9	7.6		5.8	6.5		4.5	83.2			
17 (933)	10.0		E	F	U	N	C	I	O	N					
19 (933)	3.0	2.3	D	E	F	U	N	C	I	O	N				
11 (H30)	2.5	2.4	14.9	5.7	2.5	8.1		5.4	5.5		2.9	2.1			
12 (H30)	3.3	3.9	26.0	NR	7.8	2.8		7.3	9.0		2.2	6.0			

PH Representa el muestreo posterior a la hemólisis realizada en los animales del grupo control positivo

* Los valores se expresan en mg/dl.

NR No Realizada

CUADRO 5

RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS DETERMINACIONES DE
HAPTOGLOBINA SERICA DE LOS ANIMALES EN EXPERIMENTACION

No. TRATAMIENTO	PREOPERATORIO	POSTOPERATORIO (NUMERO DE MUESTRO)													
		1	2	3	4	5	PH	6	7	PH	8	9	10	PH	11
1 TESTIGO	459	81	NR	91	77	73		59	59		64	55			
3 TESTIGO	64	66	NR	55	NR	55		NR	105		NR	111			
2 CONTROL (+)	91	82	45	77	32	82	82	41	45	41	55	39	23	0	36
4 CONTROL (+)	45	68	68	105	91	77	100	82	77	64	73	100	45	23	68
6 CONTROL (-)	105	82	95	77	109	91		NR	77		41	68			
18 CONTROL (-)	50	109 D E F U N C I O N													
7 (933J)	40	36	32	NR	100	NR		100	114		95				
16 (933J)	64	95	82	82	105	73		NR	123		82	95			
9 (933W)	36	100	27	NR	123	68		NR	110		95				
15 (933W)	77	18	22	91	D	E	F	U	N	C	I	O	N		
14 (933)	50	105	68	95	77	82		45	45		45	32			
17 (933)	41	D E F U N C I O N													
19 (933)	114	109 D E F U N C I O N													
11 (H30)	82	100	64	82	123	91		82	30		82	68			
12 (H30)	50	64	18	109	50	82		73	77		95	82			

PH Representa el muestreo posterior a la hemólisis efectuada en los animales del grupo control positivo.

* Los valores se expresan en mg/dl

NR No realizado

CUADRO 6

RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS DETERMINACIONES DE
UREA SERICA EN LOS ANIMALES EN EXPERIMENTACION

No. TRATAMIENTO	PREOPERATORIO	POSTOPERATORIO (NUMERO DE MUESTRO)													
		1	2	3	4	5	PH	6	7	PH	8	9	10	PH	11
1 TESTIGO	44	30	NR	28	24	36		42	50		34	32			
3 TESTIGO	38	61	NR	32	NR	38		71	44		NR	44			
2 CONTROL (++)	26	30	53	50	48	34	42	56	48	40	50	58	36	36	26
4 CONTROL (++)	36	34	38	53	46	40	32	22	24	26	30	44	44	44	22
6 CONTROL (-)	38	34	36	36	44	50		NR	32		65	48			
18 CONTROL (-)	32	25	D	E	F	U	N	C	I	O	N				
7 (933J)	30	28	30	NR	28	NR		32	50		22				
16 (933J)	34	28	26	22	45	27		NR	32		38	36			
9 (933W)	32	34	20	NR	30	48		NR	22		22				
15 (933W)	23	18	22	23	D	E	F	U	N	C	I	O	N		
14 (933)	35	23	21	18	24	22		45	27		32	32			
17 (933)	60	D	E	F	U	N	C	I	O	N					
19 (933)	32	22	D	E	F	U	N	C	I	O	N				
11 (H30)	20	10	25	14	16	22		20	23		30	27			
12 (H30)	44	20	80	68	45	49		42	39		56	41			

PH Representa el muestreo posterior a la hemólisis efectuada en los animales del grupo control positivo.

• Los valores se expresan en mg/dl

NR No realizado

CUADRO 7

HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS OBSERVADOS
EN LOS ANIMALES EN EXPERIMENTACION.

No. Org	1 TESTIGO	3 TESTIGO	2 CONTROL(+)	4 CONTROL(+)	6 CONTROL(-)	18 CONTROL(-)
INTESTINO Anastomosis	Enteritis catarral subaguda ligera. Atrofia de vellocida- des.	Enteritis catarral subaguda ligera. Atrofia de vellocida- des.	Enteritis catarral subaguda severa. Atrofia de vellocida- des.	S. C. P. A	S. C. P. A.	S. C. P. A.
INTESTINO Segmento	Enteritis catarral subaguda ligera. Atrofia de vellocida- des	Enteritis catarral crónica moderada Atrofia de vellocida- des	Atrofia	Atrofia	Atrofia	Enteritis catarral subaguda moderada.
RINON	Neftrosis ligera	Neftrosis ligera	Glomérulo- neftritis prolifera- tiva. Neftro- sis modera- da.	S. C. P. A	Neftrosis ligera	Neftritis intersticial crónica.
HIGADO	Hepatitis ligera	NR	Necrosis hepática multifocal Hemosidero- sis.	Hemoside- rosis mul- tifocal. Hemólisis intravas- cular. Hepa- tosis mode- rada.	NR	Hepatitis severa Hemólisis intravascular Hemosiderosis
PERITONEO	S. C. P. A	Peritoni- tis puru- lenta fo- ral aguda	S. C. P. A.	S. C. P. A.	S. C. P. A.	Peritonitis fibrinosa aguda severa
GANGLIO LINFÁTICO	NR	NR	Hiperplasia linfocida mo- derada. Hemo- siderosis difusa mo- derada.	Hiperplasia linfocida mo- derada. Hemo- siderosis difusa mo- derada	NR	NR

CUADRO 7

No. Org.	7 933J	16 933J	9 933W	14 933	19 933	11 H30	12 H34
INTESTINO Anastomosis	Enteritis catarral subaguda moderada. Necrosis del verti- ce de ve- llicidades	Enteritis catarral subaguda moderada. Necrosis del verti- ce de ve- llicidades	Enteritis catarral subaguda severa. Trombosi en vasos sanqui -- neos.	Enteritis catarral subaguda moderada. Necrosis del verti- ce de ve- llicidades	Enteritis catarral subaguda moderada. Necrosis del verti- ce de ve- llicidades	Enteritis catarral subaguda ligera.	Enteritis catarral subaguda ligera
INTESTINO Segueto	Enteritis catarral subaguda severa.	Enteritis catarral subaguda moderada.	Enteritis catarral subaguda ligera. He- mosiderosis	Enteritis catarral eosinofili- ca subaguda ligera. Atro- fia de vello- cidades.	Licuefac- ción total	Enteritis catarral eosinofili- ca subaguda ligera. Atro- fia de ve- llicidades	Enteritis catarral subaguda ligera. Atro- fia de vello- cidades.
RINON	Nefrosis moderada	Necrosis tubular severa.	Nefrosis severa Coagulación intravascu- lar.	Nefritis intersticial crónica moderada.	Necrosis tubular aguda se- vera. Hemó- lisis in- travascular	S. C. P. A	Pielonefri- tis aguda severa. Nefri- tis intersti- cial subaguda
HIGADO	Necrosis coagulati- va multifo- cal modera- da.	Necrosis coagulati- va multifo- cal modera- da.	Necrosis coagulati- va difusa severa. He- mosidero- sis.	NR	Necrosis coagulati- va aguda severa.	NR	Necrosis coagulativa multifocal ligera.
PERITONEO	Peritonitis fibri- no purulen- ta local severa.	S. C. P. A	Peritonitis fibri- no purulen- ta local severa.	S. C. P. A.	Peritonitis fibri- no purulen- ta aguda se- vera.	S. C. P. A	Peritonitis fibri- no purulen- ta modera- da
BAZO	S. C. P. A.	S. C. P. A.	Hemoside- rosis con eritrofo- citososis	Infarto ro- jo. Hiperplasia linfoides ligera	S. C. P. A.	S. C. P. A.	Hiperplasia linfoides ligera

CUADRO 8

EXAMENES BACTERIOLÓGICOS REALIZADOS A LAS MUESTRAS DEL CONTENIDO DEL SEGMENTO INTESTINAL OBTENIDAS A LA NECROPSIA DE LOS ANIMALES EN EXPERIMENTACION.

No.	TRATAMIENTO	AISLAMIENTO	CITOTOXINAS
1	Testigo	N.C.	Negativo
3	Testigo	Contaminante*	Negativo
2	Control (+)	N.C.	Negativo
4	Control (+)	N.C.	Negativo
6	Control (-)	N.R.	N.R.
18	Control (-)	Contaminante	Negativo
7	933J	<u>E. coli</u>	Positivo
16	933J	<u>E. coli</u>	Positivo
9	933W	<u>E. coli</u>	Positivo
14	933	<u>E. coli</u>	Positivo
19	93J	<u>E. coli</u>	Positivo
11	H30	<u>E. coli</u>	Positivo
12	H30	<u>E. coli</u>	NR

& La actividad fue determinada sobre células Vero.

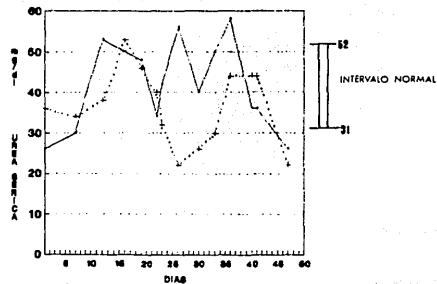
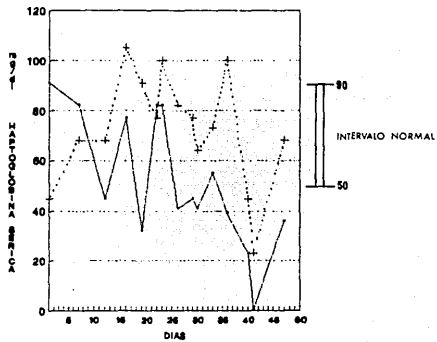
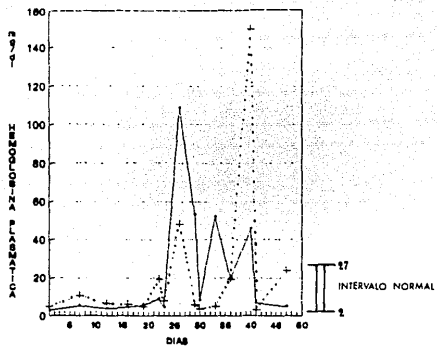
* La bacteria no correspondía bioquímicamente a E. coli

N.C. No desarrolló crecimiento.

NR No realizado.

VALORES OBTENIDOS EN PERROS DEL GRUPO
CONTROL POSITIVO DE HEMOLISIS

50



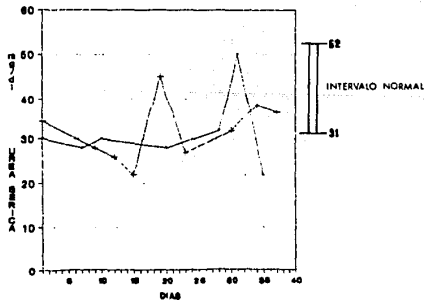
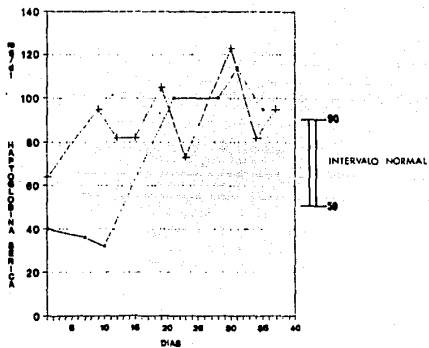
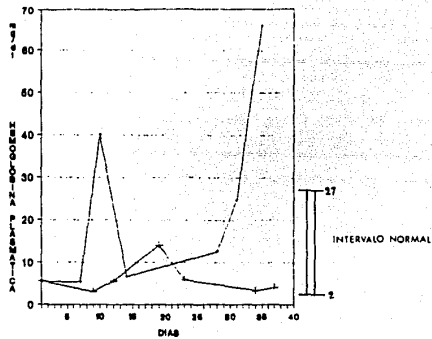
--- PERRO 2 PERRO 4

INDICAR EL DIA DE LA HEMOLISIS

FIGURA 1

VALORES OBTENIDOS EN PERROS INOCULADOS
CON CEP 933J DE S. COLI

51

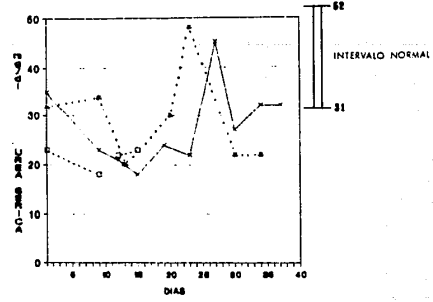
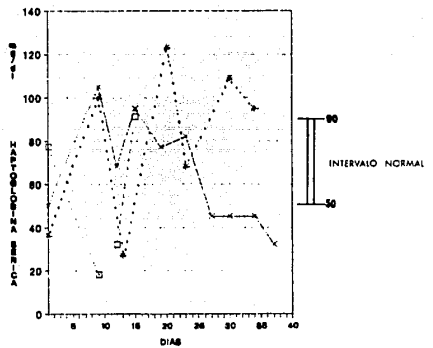
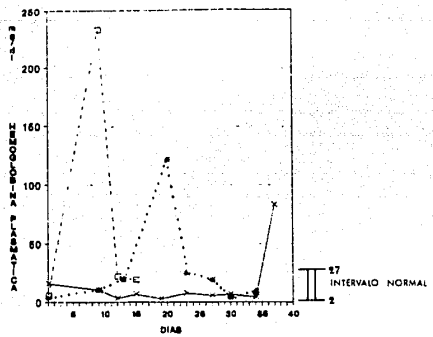


--- PERRO 7 (933J) — PERRO 18 (933J)

FIGURA 2

VALORES OBTENIDOS EN PERROS INOCULADOS
CON CEPAS 933W Y 933 DE E. COLI

52

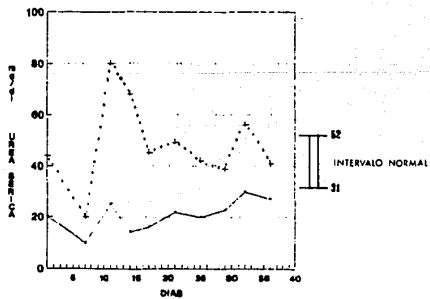
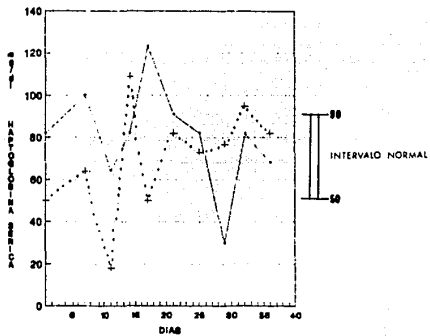
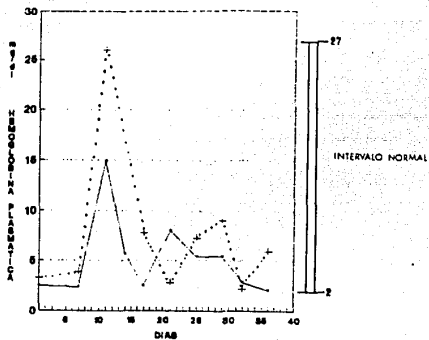


--- PERRO 9 (933W) □ PERRO 16 (933W)
 --- PERRO 14 (933)

FIGURA 8

VALORES OBTENIDOS EN PERROS INOCULADOS
CON CEPA H30 DE E. COLI

53



— PERRO 11 ···· PERRO 12

FIGURA 4

D I S C U S I O N

Los valores sanguíneos preoperatorios presentados en el CUADRO No. 2, así como los intervalos calculados a partir de la $\bar{X} \pm 1S$ nos revelan que los resultados de las pruebas de Biometría Hemática y los conteos plaquetarios concuerdan con los valores citados en la literatura para animales sanos (5, 9, 12, 34). La urea sanguínea se muestra ligeramente por encima de lo considerado normal, pero hay que tener en cuenta que existen factores, como la dieta, que modifican su concentración (5, 16), además dichos rangos fueron determinados por estudios realizados en otros países.

Los niveles normales reportados para Haptoglobina sérica van desde 30 a 200 mg/dl, siendo más común encontrarlos alrededor de 100 mg/dl y para la Hemoglobina plasmática valores por debajo de 25 mg/dl. Los resultados obtenidos antes de la cirugía coinciden con esos datos (20, 21, 39).

En condiciones normales la orina del perro presenta una densidad entre 1.015-1.045 y un intervalo de pH de 6-7. Estos valores son modificados por el consumo de agua y el tipo de dieta. No debe de contener proteínas, sin embargo puede ocurrir como reacción fisiológica después de ejercicio muscular intenso, estrés emocional e ingestión excesiva de proteínas. La presencia de cierto número de células epiteliales escamosas y transitorias y una leve cilindruria de tipo hialino y granuloso es considerado

normal en las muestras (1, 5, 9, 12).

De acuerdo a lo anterior los exámenes de orina realizados antes de la cirugía demostraron que los animales se encontraban aparentemente en buen estado de salud. La proteinuria pudo deberse al estrés al que estaban sometidos los perros y cabe señalar que los 8 animales donde se observaron cilindros en el sedimento urinario estaban los animales otorgados por la Unidad de Cirugía.

En el perro la respuesta leucocitaria al estrés y a infecciones es muy alta y es común encontrarla posterior a cirugías extensas debido al daño considerable producido en tejidos. Se consideran como causas comunes de leucocitosis las infecciones generalizadas y locales, intoxicaciones, neoplasias, hemólisis brusca y traumatismos (5, 9, 12, 34). De acuerdo a estos preceptos se explican los diversos grados de leucocitosis con desviación a la izquierda ocurridos en la primera mitad del postoperatorio y su tendencia a desaparecer nos indica un pronóstico favorable del proceso. La permanencia de la leucocitosis en el perro No.4 (control positivo) pudo deberse a las hemólisis efectuadas y al proceso alérgico e infeccioso desarrollado por la probable picadura del insecto. La leucocitosis moderada que se presentó en la primera mitad del experimento en el animal No. 3 (grupo testigo) probablemente fue provocada por la peritonitis localizada en el Área de anastomosis intestinal. La bacteria inoculada en los perros No. 9 (cepa 933W) y 14 (cepa 933) pudo contribuir a la leucocitosis que mostraron en la segunda mitad del

estudio, aunque también podríamos atribuir ésta en el No. 9 a la metritis, maceración del feto y aborto observados en el experimento probablemente ocasionados por la inoculación. En el animal No. 12 (cepa H30) se desarrolló una leucocitosis moderada debida a la infección del tracto urinario que presentó.

Los resultados de las pruebas en sangre que aparecen en el CUADRO No. 3 nos indican que la mayoría de los perros presentó algún grado de anemia macrocítica como respuesta común en las anemias de tipo regenerativo por pérdida de sangre y hemólisis en el transcurso del experimento con respecto a los intervalos basales preoperatorios. Muchos de estos valores, si se comparan con los indicados en la bibliografía, se encuentran dentro de los normales (5, 9, 12, 34). En general puede atribuirse la baja de los valores en un principio a la intervención quirúrgica a la que fueron sometidos y no tanto a la presencia de las cepas inoculadas. El historial clínico y los hallazgos a la necropsia del animal No. 3 (Testigo) nos sugiere como causa de la anemia el estado de inanición aunado al proceso infeccioso localizado en el intestino. Los niveles bajos aparecidos hacia el final del estudio en los animales control positivo podría deberse a las distintas hemólisis efectuadas en estos perros. En el canino No.6 (control negativo) se presentó un descenso y aumento gradual de sus valores de glóbulos rojos posiblemente como una respuesta individual idiosincrática al estrés del manejo. Las hembras No.7 (cepa 933J) y 9 (933W) en las que la anemia se manifestó hacia el final del experimento posiblemente fue causada por la hemólisis detectada por medio de las pruebas de laboratorio. La anemia del perro No.

12 (capa H30) probablemente fue consecuencia del sangrado urinario y la pielonefritis que sufría el animal.

En eventos hemolíticos intravasculares la Hemoglobina libre (Hb) es captada en primera instancia por la Haptoglobina (Hp), la cual es sintetizada en hígado, formandose un complejo Hb-Hp que que es trasladado al hígado degradación, si la hemólisis intravascular es muy severa o continua, los niveles de Haptoglobina bajan y se activan simultáneamente otros procesos de compensación para evitar la pérdida de hierro y el acumulo de Hemoglobina en sangre. La hemoglobina libre que no es captada se filtra por vía renal y puede aún ser reabsorbida y catabolizada por las células tubulares, si se excede su capacidad (90-100 mg/dl) aparece hemoglobinuria. A consecuencia de esto la concentración de hemoglobina plasmática libre aumenta marcadamente y los niveles de haptoglobina sérica decrecen abruptamente en procesos hemolíticos intravasculares. Por otra parte en reacciones inflamatorias y neoplásicas la Haptoglobina sérica se incrementa (20, 21, 38, 39).

En hemólisis intravascular histológicamente se producen acúmulos de hemosiderina principalmente en células del sistema reticuloendotelial y de túbulos renales. Cuando existe una crisis hemolítica intravascular aguda se forman gotas intracitoplasmáticas en células de tubulos proximales, también se pueden encontrar cilindros de proteína. Macroscópicamente el riñón adquiere una co-

loración oscura. (15, 31).

En los animales del grupo control positivo los resultados de hemoglobina plasmática (Hb/p) mostraron estar dentro del intervalo normal hasta el momento de realizarse la primera hemólisis después de la cual y aunado a las efectuadas posteriormente los valores comenzaron a tener aumentos y decrementos significativos. El perro No. 2 mantuvo una reacción más sostenida observándose tres picos de aumento siendo el primero más elevado, mientras que el perro No. 4 sólo tuvo dos picos de aumento entre la primera y tercera hemólisis obteniéndose en la última el valor máximo. Correlacionando estos resultados con los obtenidos en haptoglobina sérica (Hp/s) tenemos que del mismo modo antes de las hemólisis los valores se encontraron en el intervalo normal o ligeramente por encima (pudiendo ser de origen inflamatorio) o por debajo del mismo pero todavía dentro de lo enmarcado como normal en la literatura (21, 38, 39). Después de la primera hemólisis los resultados no se muestran muy afectados e incluso en el No. 4 se ven ligeramente aumentados posiblemente por la reacción inflamatoria y alérgica que presentó. Similar comportamiento se vio en la segunda hemólisis. En la tercera hemólisis en ambos perros ya se observó una disminución de la Hp/s, la cual fue más evidente en el perro No. 2 donde se llegó a alcanzar niveles de hasta 0 mg/dl. Estos resultados nos indican que la determinación de Hb/p para evaluar hemólisis intravascular fue más específica y sensible en el presente estudio que la detección de Hp/s ya que sus valores no fueron afectados por las reacciones inflamatorias desarrolladas a lo largo del postoperatorio. Pero hay

que considerar que la técnica a para medir Hp/s es mucho más práctica y sencilla de realizar ya que sus reactivos son más estables y fáciles de preparar.

Las técnicas empleadas para la valoración de hemólisis intravascular pueden ser aplicables en perros puesto que arrojaron valores comparables con los descritos en la literatura, además de que existe una respuesta acorde al marco teórico en los animales hemolizados.

La hemosiderosis encontrada en los ganglios linfáticos e Hígado y el aumento de urobilinogeno urinario son también sugestivos de que efectivamente se produjo hemólisis intravascular en estos perros (5, 15, 31).

En los perros de este grupo hubo evidencias de daño renal al observarse abundantes cilindros epiteliales en el sedimento urinario a partir de la cuarta semana y hasta el término del experimento. Sólo se desarrolló ligera uremia en el perro No.2 el cual tuvo lesiones microscópicas de glomerulonefritis proliferativa y nefrosis moderada atribuibles a los episodios hemolíticos provocados. El que no se observaran este tipo de alteraciones en el perro No. 4 probablemente se deba a una resistencia individual al daño renal o un sistema compensador de la hemólisis más eficiente. El hecho de que los dos animales no desarrollaran hemoglobinuria puede deberse a una reabsorción de la hemoglobina libre realizada por células tubulares renales explicándose por es-

ta vía la presencia histopatológica de proteínas en la luz de los tubulos en el perro No. 2.

Durante el postoperatorio los perros No. 9 y 15 inoculados con cepa 933W presentaron una considerable elevación de la Hb/p a los 8 días postinoculación en el primero y coincidiendo con una baja notable de Hp/s, y en el segundo a los 19 días con un decremento anterior a los 12 días de Hp/s. La hembra No.9 fue el único animal que mostró trombocitopenia desde el inicio hasta los 22 días postinoculación. La hembra No. 7 (cepa 933J) y el macho No. 14 tuvieron una elevación de la Hb/p con tendencia a la disminución de la Hp/s en los días 34 y 36 respectivamente. La elevación y disminución temprana de la Hb/p y Hp/s así como la muerte tan acelerada y las severas lesiones encontradas en los tejidos de los animales No. 17 y 19 inoculados con la cepa 933 pudieron deberse a la presencia de altos títulos de VT2 liberados al sobrenadante y absorbidos en el segmento al igual que los hallazgos localizados al final en los perros No. 7 y 14 posiblemente fueron causados por la producción de VT1 in situ ya que esta toxina es más asociada a la bacteria (26, 35).

No se encontraron indicios de uremia en los perros inoculados con las cepas 933 y sus variantes. Los análisis de sedimento urinario de las hembras No.7(cepa 933J) y 9 (cepa 933W) correspondientes a las dos últimas semanas postinoculación revelaron daño renal al observarse abundantes cilindros epiteliales, tomando en cuenta la nefrosis que mostró en sus estudios

histopatológicos , este fue moderado en la No. 7. Las lesiones más interesantes se observaron en los perros No. 9 (933W) y 19 (933) y pueden relacionarse con hemólisis intravascular y daño directo a tejidos provocados por VT2. En la perra No.9 la nefrosis fue severa y se observó coagulación intravascular (la trombocitopenia desarrollada puede explicarse por esta vía) con trombos hialinos a nivel glomerular. La hemosiderosis severa estuvo presente en hígado, bazo y segmento intestinal observándose en éste último eritrofagocitosis, lo cual sugiere que existe un daño directo debido a la toxina que lesiona la membrana eritrocítica. También se encontró Necrosis hepática difusa severa. En el perro No. 19 las lesiones producidas fueron más agudas y severas (tomando en cuenta que murió a sólo una semana postinoculación) encontrándose Necrosis tubular en riñón, necrosis hepática y hemólisis intravascular. La coloración macroscópica oscura que adquirieron los riñones de los animales No. 17 y 19 sugiere sea consecuencia de alta concentración de hemoglobina debido a hemólisis intravascular, lo que fue confirmado sólo en el No. 19 en sus estudios de histopatología. Las lesiones que presentó el No. 14 probablemente se desarrollaron por endotoxemia.

Los animales inoculados con la cepa H30 no desarrollaron hemoglobinemia y sólo hubo una ligera disminución de Hp/s a los 10 días en el animal No. 12 que puede ser atribuible a una baja aportación hepática más que debido a hemólisis (21, 38, 39). En este perro hubo periodos urémicos que se manifestaron a los 10 días postinoculación, lo cual sugiere una rápida diseminación por vía ascendente de la infección localizada en vejiga y el desarro-

llo de la pielonefritis en dicho animal. Este proceso fue independiente y se asoció a retención de orina al estar confinado en las jaulas individuales (1, 5). En general podemos decir que aparentemente no existió efecto en este grupo debido a la presencia de la bacteria inoculada la cual incluso no desarrolló crecimiento a partir del segmento al final del experimento.

En resumen los animales inoculados con cepas 933 y sus variantes manifestaron evidencias de hemólisis intravascular con cierto grado de lesión renal sin llegar a producir uremia e IRA. Es altamente sugestivo que los daños fueron causados por las bacterias inoculadas debido a que estas fueron aisladas del contenido de los segmentos intestinales tomados en las necropsias y además se detectó la presencia de las citotoxinas.

En base a lo anterior proponemos el siguiente mecanismo en el SUH que la bacteria y la toxina se incorporan al torrente sanguíneo causando en primera instancia daño a células sanguíneas produciéndose trombocitopenia y hemólisis intravascular con la correspondiente anemia, posteriormente una lesión renal debida al efecto de la citotoxina. Además pudiera pensarse en un daño renal por la propia hemoglobina fundamentandose en las lesiones encontradas en los animales inoculados con la cepa 933 que fallecieron a sólo una semana postinoculación. También se puede proponer la acción directa de la toxina en otros tejidos por la severa necrosis hepática y licuefacción del segmento intestinal que se evidenció en animales inoculados. La IRA con síndrome urémico posi-

blemente se desarrolle al final a causa de un daño renal más severo, debido a la citotoxina. Un dato que corrobora la absorción de las toxinas es la diarrea hemorrágica desarrollada en algunos de los animales inoculados.

El modelo quirúrgico en caninos planteado para llevar a cabo el experimento, al parecer resulta apropiado para el estudio del SUH, es compatible con la vida del animal y proporciona las condiciones necesarias para que la bacteria se conserve viable, produzca toxinas, sean absorbidas y ocasionen daños en tejidos. Sería recomendable para asegurarse del estado de salud de los caninos se utilizaran individuos jóvenes, vacunados y de preferencia sean criados específicamente para experimentación, sobretudo para evaluar el daño renal que se ocasione por las bacterias. Esto fue parcialmente solventado en el presente estudio con la utilización de la camada proporcionada por el INIFAP. La punción directa a través de cavidad abdominal para extraer el contenido del segmento intestinal tal vez sea la responsable de la peritonitis encontrada en perros inoculados, sería más recomendable evitarla y concretarse sólo a la toma de contenido intestinal a la necropsia, ya que es la que nos da la certeza de que se tomó realmente de dicho sitio. Claro está que sería de gran ayuda el muestreo a lo largo del experimento y debería pensarse en otra forma de conseguirlo sin ocasionar problemas que afecten al experimento.

Debido a que los resultados de algunos perros inoculados con cepas 933J y 933 indican que la hemólisis intravascular se presentó hacia el final del experimento nos sugiere que el mismo podría alargarse por lo menos 2 semanas más para analizar si se producen efectos en ese lapso y concretar un poco más sobre el papel de las toxinas.

Nuestros resultados indican una aparente mayor patogenicidad de la VT2 ya que los valores de laboratorio y las lesiones encontradas fueron más significativas en los animales inoculados con la cepa 933W y a que existió un efecto casi nulo en los inoculados con la cepa 933J. Podría realizarse un experimento similar con las recomendaciones propuestas, con más animales para que el estudio sea estadísticamente representativo utilizando las cepas 933 y sus variantes 933J y 933W ya que la cepa H30 aparentemente no causó daños probablemente debido a que no se desarrolló dentro del segmento, por lo menos en este experimento.

C O N C L U S I O N E S

- El perro puede ser un modelo experimental útil para estudiar y evaluar el SUH.
- Las cepas 933 y 933W de E. coli resultaron ser más patógenas a las demás cepas empleadas en la reproducción del SUH.
- La cepa H30 no produjo daños compatibles con SUH.
- Las cepas productoras de VT2 produjo un daño hemolítico, renal y de necrosis tisular más evidente mientras que las cepas productoras de VT1 sólo causaron un daño hemolítico ligero.
- En base a nuestros resultados se propone como posible patogenicidad del SUH que las toxinas bacterianas penetran al torrente sanguíneo a partir del tubo digestivo causando un daño directo a tejidos. El primer blanco de acción son las células sanguíneas, posteriormente riñón y otros tejidos como hígado e intestino.

- Las técnicas empleadas para la determinación de hemoglobina plasmática y haptoglobina sérica son aplicables a nivel veterinario.
- Los valores normales (n=15) para la hemoglobina plasmática fueron de 5.51 +/- 3.22 mg/dl y para la haptoglobina sérica de 64.53 +/- 23.46mg/dl.

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Alanis Calderon, L.J.: Fundamentos sobre Urologia Clínica en perros y gatos. U.N.A.M. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Dep. de Med. y zoot. para pec. especies. 1988.
- 2.- Annis, J.R. y Allen, A.R.: Atlas de Cirugía Canina. Unión Tipográfica Hispanoamericana, México. 1975.
- 3.- Archibald, J. : Canine Surgery. 2a ed. American Veterinary Publications, U.S.A. 1974.
- 4.- Baker, N.M., Mills, A.E., Rachman, I. & Thomas, J.E.F. "Haemolytic-Uraemic Syndrome in Typhoid Fever." British Med. Jour. 2:84-87. (1974).
- 5.- Benjamin, M.M. : Manual de Patología Clínica en Veterinaria. Limusa, México. 1984.
- 6.- Bitzan, m. Karch, H., Altrogge, H., Strehav, J. and Blaker, F. : "Hemolytic-uremic syndrome associated with a variant Shiga-like cytotoxin of E.coli O111" Pediatr Infect Dis. J. 7 (2):128-132 (1988).
- 7.- Bojrab, M.J. : Medicina y Cirugía en Especies Pequeñas. C.E.C.S.A., México. 1983.
- 8.- Borczyk, A.A., Karmali, M.A., Lior, H. and Duncan, L.M.C. : "Bovine reservoir for Verotoxin-Producing Escherichia coli O157:H7." Lancet 1(8524): 98. (1987).
- 9.- Coles, E.H. : Diagnóstico y Patología en Veterinaria. 4a ed. Interamericana, México. 1989.
- 10.- Daniel, W.W. : Bioestadística. Limusa, Mexico. 1984.
- 11.- Doyle, M.P. & Schoeni, J.: "Isolation of Escherichia coli O157: from Retail Fresh Meats and Poultry." Appl and Environ Microb 53(10): 2394-2396. (1987).
- 12.- Duncan, J.R. and Prasse, K.W. : Veterinary Clinical Pathology Iowa University Press, USA. 1985
- 13.- Frandson, R.D. : Anatomía y Fisiología de los animales Domésticos. 3a ed. Interamericana, México. 1985.
- 14.- Gázquez Ortiz, A. : La Necropsia en los mamíferos domésticos. Interamericana, Madrid. 1988.

- 15.- Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. and Palmer, N.
Pathology of Domestic Animals. (Volume 2).
3th ed. Academic Press Orlando, Florida. 1985.
- 16.- Kaneko J. Clinical Biochemistry of Domestic Animals
Third edition Academic Press Orlando, Florida. 1985.
- 17.- Karmali, M.A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P.O.,
Arbus, G.S. & Liot, H.: "The Association Between
Idiopathic Hemolytic Uremic Syndrome and Infection
by Verotoxin-Producing *Escherichia coli*."
J. Infect. Dis. 151: 775-782. (1985).
- 18.- Karmali, M.A., Steele, B.T., Petric, M. & Lim, C.:
"Sporadic cases of Haemolytic-Uraemic Syndrome associated
with faecal cytotoxin and Cytotoxin-Producing
Escherichia coli in stools." Lancet 1: 619-620. (1983).
- 19.- Kavi, J., Chant, I., Maris, M. and Rose, P.E. :
"Cytopathic effect of Verotoxin on Endothelial cells."
Lancet 2: 1035. (1987).
- 20.- Kitagawa, H., Sasaki, Y. and Ishihara, K.: "Clinical
Studies on Canine Dirofilarial Hemoglobinuria:
Relationship between the Presence of Heartworm Mass at
the Tricuspid Valve Orifice and Plasma Hemoglobin
Concentration." Jpn. J. Vet. Sci. 48(1): 99-103. (1986).
- 21.- Kitagawa, H., Sasaki, Y., Matsui, A., Ishihara, K. and
Uchiyama, T. : "Serum Haptoglobin Levels in Canine
Dirofilariasis." Jpn. J. Vet. Sci. 49(2): 261-266. (1987).
- 22.- Koster, F., Levin, J., Walker, L., Tung, K.E.K., Gilman,
R.H., Rahaman, M.M., Majid, M.A., Islam, S. and
Williams, R.C. Jr.: "Hemolytic-Uremic Syndrome after
Shigellosis." N. Engl. J. M. 298(17): 928-933. (1974).
- 23.- Mainil, J.G., Duchesnes, C.J., Whipp, S.C., Marques,
L.R.M., O'Brien, A.D., Casey, T.A. and Moon, H.W. :
"Shiga-like toxin production and attaching effacing
activity of *Escherichia coli* associated with calf
diarrhea." Am. J. Vet. Res. 48(5): 743-748. (1987).
- 24.- Mathews, K., Doherty, T., Dyson, D. and Wilcock, B. :
"Renal Failure in dogs associated with Flunitrazepam
anesthesia and Metoxiflurane anesthesia." Vet Sur 16(4):
323. (1987) Abstract from the Veterinary Midwest
anesthesia Conference.

- 25.- Nell, M.A., Agosti, J. and Rosen, H.: "Hemorrhagic Colitis with *Escherichia coli* O157:H7 preceding Adult Hemolytic Uremic Syndrome. Arch. Inter. Med. 145:2215-2217. (1985).
- 26.- O'Brien, A.D., Laveck, G.D., Thompson, M.R. and Formal, S.B.: "Production of *Shigella dysenteriae* Type 1-like Cytotoxin by *Escherichia coli*." J. Infect. Dis. 146: 763-769. (1983).
- 27.- O'Brien, A.D., Newland, J.W., Miller, S.F. and Holmes, R.K.: "Shiga-like toxin-converting Phages from *Escherichia coli* Strains that cause Hemorrhagic Colitis or infantile Diarrhea." Science 226(9): 694-696. (1984).
- 28.- O'Brig, T.G., Del Vecchio, P.J., Karmali, M.A., Petric, M., Moran, T.P. and Judge, T.K.: "Pathogenesis of haemolytic Uraemic Syndrome." Lancet 2:697. (1987).
- 29.- Orskov, F. Orskov, I. and Villar, J.A.: "Cattle as Reservoir of Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7." Lancet 2: 276. (1987).
- 30.- Osborne, W.R.A., Deeg, H.J. and Slichter, S.J.: "A canine model of induced purine nucleoside phosphorilase deficiency." Clin. Exp. Imm. 66: 166-172. (1986).
- 31.- Robbins, S.L. and Cotran, R.S.: *Patologia Estructural y Funcional*. 2a ed. Interamericana México. 1984.
- 32.- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D. McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.F., Blake, P.A., Cohen, M.L. "Hemorrhagic Colitis associated with a rare *Escherichia coli*." N. Engl. J.M. 308(12): 618-685. (1983).
- 33.- Scotland, S.M., Willshaw, G.A., Smith, H.R. and Rowe, B.: Properties of strains of *Escherichia coli* belonging to serogroup O157 with special reference to production of Vero cytotoxins VT1 and VT2. Epidem. Inf. 99:613-624. (1987).
- 34.- Schalm, O.W., Jain, N.C. and Carroll, E.J.: *Veterinary Hematology*. 3a ed. Lea and Febiger Philadelphia, USA. 1975.
- 35.- Sherman, P., Soni, R. and Karmali, M.: "Attaching and Effacing Adherence of Vero Cytotoxin-Producing *Escherichia coli* to Rabbit Intestinal Epithelium in vivo." Infect. Immun. 56: 756-761. (1988).

- 36.- Smith, H.W., Green, P. and Parsell, Z.: "Vero Cell Toxins in Escherichia coli and Related Bacteria: Transfer by Phago and Conjugation and Toxic Action in Laboratory Animals, Chickens and Pigs." J. Gen. Microbiol. 129: 312-317. (1983).
- 37.- Smith, H.R., Scotland, S.M., Willshaw, G.A., Wray, I.C., McLaren, I.M., Cheasty, T. and Rowe, B.: "Vero Cytotoxin Production and Presence of VT genes in Escherichia coli strains of animal origin." J. Gen. Microbiol. 134: 829-834. (1988).
- 38.- Sodeman, W.A. and Sodeman, T.M.: Fisiopatologia Clinica, 6a ed. Interamericana, Mexico. 1988.
- 39.- Sonnenwirth, A.C. and Jarett, L.: Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis (Volume One) Eighth ed. Mosby Company USA. 1983.
- 40.- Tello Vasconcelos, J.G.: Manual de Laboratorio Clinico Veterinario. Tesis Licenciatura. FES-Cuautitlan. U.N.A.M. 1987.
- 41.- Torrance, A.G. and Fulton, R.B.: "Zinc-induced hemolytic anemia in a dog." JAVMA. 191(4): 443-444. 1987.
- 42.- Tzipori, S., Karch, H., Wachsmuth, K.I., Robins-Browne, R.M., O'Brien, A.D., Lior, H., Cohen, M.L., Smithers, J. and Levine, M.M.: "Role of a 60-Megadalton Plasmid and Shiga-Like Toxins in the Pathogenesis of Infection Caused by Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in Gnotobiotic Piglets." Infect. Immun. 55: 3117-3125. (1987).
- 43.- Tzipori, S., Wachsmuth, K.I., Chapman, C., Birner, R., Brittingham, J., Jackson, C. and Hogg, J.: "The Pathogenesis of Hemorrhagic Colitis caused by Escherichia coli O157:H7 in Gnotobiotic Piglets." J. Infect. Dis. 154:712-716. (1986).
- 44.- "Unravelling HUS." : Lancet 2:1437-1440. (1987).
- 45.- Watson, A.D.J., Church, D.B. and Fairburn, A.J.: "Postpandrial Changes in plasma Urea and Creatinine concentrations in dogs." Am. J. Vet. Res. 42(11): 1878-1880. (1981).